

Universitat de Lleida

Facultad de Medicina

Grado en Nutrición Humana y Dietética

**USO DE NANOEMULSIONES
ENRIQUECIDAS EN BETACAROTENO Y
VITAMINA E COMO RECUBRIMIENTOS
COMESTIBLES: ESTUDIO DE LA
BIOACCESIBILIDAD DE SUSTANCIAS
ACTIVAS**

Autora: Anna Teixidó Aguiló

CURSO 2014/2015

**USO DE NANOEMULSIONES
ENRIQUECIDAS EN BETACAROTENO
Y VITAMINA E COMO
RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES:
ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD
DE SUSTANCIAS ACTIVAS**

Trabajo de Final de Grado presentado por: Anna Teixidó Aguiló

Tutora: Gemma Oms Oliu

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1.COMPUESTOS BIOACTIVOS	11
2.1.1.Carotenoides y β -caroteno	11
2.1.2.Vitamina E y α -tocoferol	12
2.2.RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	13
2.2.1.Uso tradicional	14
2.2.2.Vehículo para sustancias bioactivas.....	15
2.3.NANOTECNOLOGÍA y NANOEMULSIONES	16
2.3.1.Nanotecnología	16
2.3.2.Nanoemulsiones	17
2.3.2.1.Fase lipídica.....	18
2.3.2.2.Fase acuosa	19
2.3.2.3.Surfactantes.....	19
2.3.2.4.Espesante	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS.....	23
4.1.Objetivo General.....	23
4.2.Objetivos específicos	23
5. MATERIAL y MÉTODOS	25
5.1.MATERIAL	25
5.2.MÉTODOS	25
5.2.1.Elaboración del aceite enriquecido	25
5.2.2.Preparación de nanoemulsiones	25
5.2.2.1.Preparación de emulsiones convencionales	25
5.2.2.2.Formación de nanoemulsiones	26

5.2.3. Aplicación de la nanoemulsión como recubrimiento comestible	27
5.2.4. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión.....	27
5.2.4.1. <i>Tamaño de partícula e índice de polidispersión</i>	27
5.2.4.2. <i>Carga eléctrica</i>	28
5.2.4.3. <i>Viscosidad</i>	29
5.2.4.4. <i>Color</i>	29
5.2.5. Digestión <i>in vitro</i> de las distintas matrices alimenticias recubiertas	30
5.2.6. Determinación de la bioaccesibilidad de β -caroteno	31
5.2.7. Determinación de la bioaccesibilidad de α -tocoferol	31
5.2.8. Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Estudio preliminar sobre la aplicabilidad de nanoemulsiones como recubrimientos comestibles.....	33
6.2. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión.....	34
6.2.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersión.....	34
6.2.2. Potencial z	36
6.2.3. Viscosidad.....	37
6.2.4. Color	38
6.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las sustancias activas incorporadas en los recubrimientos comestibles.....	39
6.4. Bioaccesibilidad de β -caroteno	41
6.5. Bioaccesibilidad de vitamina E.....	42
7. CONCLUSIONES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	47

1. RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el uso de recubrimientos comestibles a base de alginato sódico al 2% que incluían nanopartículas lipídicas de aceite de maíz enriquecido con β -caroteno y α -tocoferol al 0,5%, en pera *Conference* fresca cortada, jamón de pavo y queso bajo en grasa. El estudio pretendía caracterizar fisicoquímicamente las nanoemulsiones para su posterior aplicabilidad como recubrimiento comestible y sistema eficiente de suministro de sustancias activas liposolubles. Los resultados obtenidos en la caracterización de la nanoemulsión y durante el proceso digestivo “*in vitro*” fueron analizados estadísticamente, aplicándose un análisis de varianza a un nivel de significación del 5%.

El proceso de microfluidización proporcionó una nanoemulsión con unas características de tamaño de partícula, homogeneidad, carga eléctrica y viscosidad adecuadas para la encapsulación de β -caroteno y α -tocoferol y para su aplicación alimentaria. La digestibilidad de la nanoemulsión fue parecida en todas las matrices, aunque la bioaccesibilidad de β -caroteno y α -tocoferol en pera fresca cortada fue superior. La falta de concordancia con la literatura citada, sugiere que deberían implantarse cambios en el entorno digestivo y en el tipo de aceite usado en la formulación del recubrimiento comestible. Aún así, se obtuvo información valiosa sobre la aplicabilidad de nanoemulsiones capaces de suministrar lípidos activos.

RESUM

El present estudi ha avaluat l'ús de recobriments comestibles a base d'alginat sòdic al 2% que inclouen nanopartícules lipídiques d'oli de blat de moro enriquit amb β -carotè i α -tocoferol al 0,5%, en pera *Conference* fresca tallada, pernil de gall d'indi i formatge baix en greix. L'estudi tenia com objectiu caracteritzar fisicoquímicament les nanoemulsions per la seva posterior aplicabilitat com a recobriment comestible i sistema eficient de subministrament de substàncies actives liposolubles. Els resultats obtinguts en la caracterització de la nanoemulsió i durant el procés digestiu "*in vitro*" van ser analitzats estadísticament, aplicant-se un anàlisi de variància, a un nivell de significació del 5%.

El procés de microfluidització va proporcionar una nanoemulsió amb característiques de mida de partícula, homogeneïtat, càrrega elèctrica i viscositat adequades per l'encapsulació de β -carotè i α -tocoferol i per la seva aplicació alimentària. La digestibilitat de la nanoemulsió va ser semblant per totes les matrius, tot i que la bioaccessibilitat de β -carotè i α -tocoferol a la pera fresca tallada va ser superior. La falta de concordança amb la literatura citada, suggereix que seria necessària la implantació de canvis en l'entorn digestiu i en el tipus d'oli utilitzat en la formulació del recobriment comestible. Tot i així, es va obtenir informació valuosa sobre l'aplicabilitat de nanoemulsions capaces de subministrar lípids actius.

SUMMARY

In this study, the use of edible coatings based on sodium alginate at 2%, including corn oil nanoparticles enriched with β -carotene and α -tocopherol at 0.5%, was evaluated on *Conference* fresh-cut pear, turkey ham and low-fat cheese. The study aimed to carry out a physicochemical characterization of nanoemulsions for further applicability as an edible coating and as an efficient supply system for liposoluble active substances. The results obtained in the nanoemulsion characterization and during the "*in vitro*" digestive process have been analyzed statistically, applying an analysis of variance at a 5% significance level. .

The microfluidization process provided a nanoemulsion with characteristics of particle size, homogeneity, electric charge and viscosity suitable for encapsulation of β -carotene and α -tocopherol on food application. Nanoemulsion digestibility was similar in all matrices, although fresh-cut pear presented the highest levels of bioavailability of β -carotene and α -tocopherol. Nevertheless, the inconsistency with the cited literature suggests that some changes should be implemented in the digestive environment and on the type of oil used for the edible coating formulation. However, valuable information has been obtained for the applicability of nanoemulsions able to supply active lipids.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los compuestos bioactivos se definen como sustancias nutritivas, o no, que se encuentran en concentraciones muy bajas en los alimentos. Intervienen en el metabolismo secundario de vegetales, y pueden tener un impacto significativo sobre la salud humana. (Meléndez-Martínez et al., 2004).

La mayoría de compuestos bioactivos están presentes en productos vegetales, como los terpenos, componentes fenólicos, vitaminas antioxidantes, fibra dietética, clorofilas y compuestos azufrados. Pero también existen en alimentos de origen animal como los ácidos grasos insaturados, péptidos bioactivos, y minerales y microorganismos, siendo estos prebióticos (Csic, 2009).

La eficiencia de absorción de componentes bioactivos como el β -caroteno y α -tocoferol ha sido objeto de muchos estudios, observándose que puede verse alterada según su estructura química, órgano diana, fuente alimentaria o por interacciones con otros componentes presentes en la ingesta como lípidos, fibra y fitoesteroles (Failla y Chitchumroonchokchai 2005; Mark et al., 2008).

2.1.1. Carotenoides y β -caroteno

Se ha puesto especial atención al papel de los carotenoides en enfermedades crónicas, pues está demostrado que dietas ricas en alimentos que contengan carotenoides y β -caroteno (frutas y verduras) reducen el riesgo de enfermedades coronarias. De igual forma, se observó que el incremento de los niveles plasmáticos de carotenoides estaba asociado con un menor daño del ADN y una mayor actividad antioxidante (Rodriguez-Amaya, 1999).

Los carotenoides forman parte del grupo de pigmentos vegetales liposolubles, derivados de ocho unidades de isopreno. Típicamente contienen 40 moléculas de carbono y múltiples enlaces carbono-carbono insaturados, conjugados en la configuración trans (Mark et al., 2008). La mayor parte de los carotenoides son sintetizados por vegetales; una menor parte, por hongos y bacterias..

Los carotenoides están presentes en todo tejido fotosintético, acompañado de clorofila, en una relación de tres a cuatro. La molécula de cromóforo, presente en sus cadena de dobles enlaces conjugados, proporciona a frutas y verduras los colores amarillos, naranjas y rojos (Mosquera et al., 2005).

De la gran familia de carotenoides, existen entre 50 y 60 precursores de vitamina A (Meléndez-Martínez et al., 2004), principalmente el β -caroteno, que es esencial para la visión nocturna y necesaria para la salud de piel y tejidos superficiales. La única fuente de provitamina A es la dieta (Mínguez-Mosquera et al., 2005), pero solo de 30 a 40 variedades de carotenoides llegan a nuestros platos en cantidades suficientes para cubrir nuestras necesidades diarias. (Mosquera et al., 2005). Factores como la cantidad, tipo y estructura de los carotenoides en la dieta, interacción con otros de la misma naturaleza, la ingesta de grasas, vitamina E y fibra, entre otros, influyen en la absorción de la provitamina A (Rodríguez-Amaya, 1999). Es en frutas y hortalizas naranjadas como las zanahorias, los mangos o la calabaza, dónde se encuentra una mayor cantidad de β -caroteno (Amparo et al., 2009).

Como se ha comentado, el β -caroteno es un pigmento importante por su elevada actividad provitamina A, pero su absorción es a menudo insuficiente y muy variable. La naturaleza lipofílica de este compuesto es la principal característica que determina las etapas del proceso de liberación, transporte y asimilación. En el hombre, la eficiencia del proceso es baja, solo un 30% de la ingesta de β -caroteno se absorbe de forma efectiva (Mínguez Mosquera et al., 2005; Qian et al., 2012). Failla y Chitchumroonchokchai (2005) y Qian et al., (2012) describieron que la acción de las lipasas gástrica y pancreática podía mejorar la absorción del β -caroteno unido a los ácidos grasos a las micelas. La absorción de carotenoides y sus metabolitos retinol esterificados han sido objeto de varias investigaciones. Debido a la complejidad logística de los estudios en humanos, la investigación deriva hacia los modelos de digestión animales y modelos de digestión *in vitro*. No obstante, debe tenerse en cuenta que el modelo de digestión *in vitro* no puede recrear con exactitud los complejos procesos fisiológicos y fisicoquímicos que ocurren en el tracto gastrointestinal. No obstante, sí son útiles para analizar la influencia de la composición y estructura de matrices potencialmente ventajosas como sistemas de suministro de compuestos bioactivos (Mark et al., 2008).

2.1.2. Vitamina E y α -tocoferol

El término vitamina E abarca un grupo de 8 componentes liposolubles naturales derivados de tocoferoles y tocotrienoles esenciales (Sayago et al., 2007), que tienen actividad vitamina E. Su estructura consta de un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Como hemos dicho, son 8 las moléculas con actividad vitamina E que se dividen en dos grupos fundamentales, 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11. Al mismo tiempo, dentro de cada grupo se diferencian en α , β , γ , δ (Sayago et al., 2007).

La vitamina E es esencial para nuestro crecimiento y supervivencia, sin embargo el cuerpo humano no puede sintetizarla y la ingiere unida a los lípidos de la dieta (Brigelius-Flohé et al., 2002). Las principales fuentes de vitamina E son los aceites vegetales como el de maíz, soja, germen de trigo y la margarina. En los productos animales, los tejidos con mayor concentración de vitamina E suelen ser los que tienen mayor contenido en lípidos; el hígado es el principal reservorio y la mejor fuente porque es desde donde la vitamina E se moviliza más rápidamente (Márquez et al., 2002).

La absorción de tocoferoles depende de los mismos factores que la digestión y absorción de lípidos a nivel intestinal, siendo esenciales para este proceso la presencia de sales biliares y enzimas pancreáticas (Márquez et al., 2002). El α -tocoferol tiene una eficiencia de absorción del 20 al 70% (Márquez et al., 2002; Sayago et al., 2007), que puede disminuir si se ingieren mayores cantidades. Un incremento de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, o su conjunta administración con sales ferrosas entre otros, interfiere con la digestión y absorción de la vitamina E.

El α -tocoferol circulante es acumulado, incorporándose a las membranas de las células junto al colesterol y los fosfolípidos (Sayago et al., 2007). El α -tocoferol es capaz de actuar contra los radicales libres, frenando su poder oxidativo al contacto con los lípidos de las membranas celulares (Brigelius-Flohe et al., 2002), además el α -tocoferol puede inducir apoptosis directa o indirectamente en las células tumorales, dependiendo de la dosis, el periodo de exposición y el tipo de células (Febles-Fernández et al., 2002). Así, parece que el α -tocoferol puede tener un papel importante en la lucha frente enfermedades coronarias, enfermedades degenerativas o el cáncer.

Se ha observado que el α -tocoferol, puede ayudar a retrasar el inicio de la diabetes mellitus tipo 2, e incluso mejorar el control de la glucemia en sangre (Brigelius-Flohé et al., 2002). Al mismo tiempo, se ha descrito que puede actuar como “regulador genético” a nivel de ARNm, modulando la transcripción de genes, traducción de proteínas y estabilidad de la molécula (Gliszczynska-Swigło y Sikorska, 2004).

2.2. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Concienciar al consumidor de la importancia de una dieta variada y equilibrada es un objetivo global. Se enfatiza en la necesidad de incorporar, al menos, cinco piezas de fruta y verduras en la ingesta diaria; pero la distribución de productos frescos no es accesible para todos ni en todo momento. Y es que las investigaciones realizadas, demuestran que esta “situación ideal” no se da en la práctica para todos los nutrientes, ni para todos los grupos de población (Cutillas et al., 2013; Díez-Gañán et al., 2007; Ortega Anta et al., 2012). El procesado de

alimentos y sus técnicas de conservación son una opción para incrementar la ingesta de frutas, verduras y hortalizas.

Los recubrimientos comestibles (RC) se describen como un método de conservación de alimentos que permiten mantener las características organolépticas del alimento a la vez que su salubridad durante un tiempo mayor (Sánchez et al., 2008). La aplicación de RC es una técnica en auge, pues va más allá de la conservación permitiendo aumentar el valor nutricional del alimento (McHugh y Senesi, 2000; Oms-Oliu et al., 2008). Se trataría de aprovechar el RC como vehículo de transporte para la incorporación de nutrientes que de otra forma no serían ingeridos en sus cantidades diarias recomendadas en una dieta habitual.

Existen compuestos difícilmente incorporables por su baja solubilidad en agua, sensibilidad al oxígeno, a la luz o a la temperatura; o porque afectan la palatabilidad del alimento. En estos casos son necesarias nuevas técnicas para suministrar los nutrientes requeridos (Robinson et al., 2009).

2.2.1. Uso tradicional

Un RC es una película que envuelve el alimento y que puede ser consumida como parte del mismo, y cuya función es mantener la calidad de los productos recubiertos. Se emplea en forma de finas capas mediante inmersión, pulverización o envolturas, dependiendo de las propiedades de las películas y la superficie de los frutos (McClements, 2010).

En general, los RC contienen ceras naturales, polisacáridos y proteínas, formando un envase ideal desde el punto de vista medioambiental, pues son biodegradables y pueden ser consumidos con el producto. Además, en el futuro, podrían reducir la necesidad de refrigeración y el coste de almacenamiento (Gutiérrez et al., 2008).

Tradicionalmente, los RC se aplican a fruta fresca cortada como estrategia para minimizar los efectos deletéreos en el procesado de alimentos (Salvia-Trujillo et al., 2015). Además, los RC pueden conseguir a extender la vida útil de este tipo de producto, reduciendo la humedad y la migración de solutos, el intercambio de gases, la respiración y los procesos oxidativos; así como minimizar los cambios fisiológicos (Rojas-Graü et al., 2009). Estos efectos se ven influidos por parámetros como el tipo de material del recubrimiento (conformación, masa molecular, distribución de cargas), las condiciones de formación de las películas (tipo de solvente, pH, concentración de componentes, temperatura, etc.), y el tipo de plastificantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes o emulsificantes que se incorporan en el recubrimiento (Figuerola et al., 2011).

El abanico de aplicaciones de los RC es muy amplio, puesto que esta tecnología permite diseñar y formular productos que se adapten según la forma de aplicación y el tipo de producto al que vayan destinados. La implementación y estudio de recubrimientos en frutas y hortalizas,

es muy variada. Varias investigaciones están orientadas a evaluar el efecto de los recubrimientos en la conservación de productos hortofrutícolas (Oms-Oliu et al., 2008; Sánchez et al., 2008). En fruta fresca cortada, los RC a base de alginato, pectina o gelano forman una atmósfera modificada pasiva que puede influir en los cambios en productos frescos y mínimamente procesados tales como actividad antioxidante, color, firmeza, calidad sensorial, inhibición del crecimiento microbiano, producción de etileno y compuestos volátiles producto del procesos de anaerobiosis (Oms Oliu et al., 2008).

2.2.2. Vehículo para sustancias bioactivas

Los consumidores día a día exigen que los alimentos frescos y mínimamente procesados estén exentos de sustancias de síntesis química, y buscan en aquellos enriquecidos con sustancias de origen natural que aporten beneficios para su salud al mismo tiempo que mantienen las características nutritivas y sensoriales propias del alimento.

Una funcionalidad importante de los RC es su habilidad para incorporar ingredientes activos, ya que pueden servir como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad del producto. Los RC han sido descritos como una buena maniobra para incorporar ingredientes activos como antioxidantes, compuestos bioactivos o antimicrobianos (Rojas-Graü et al., 2009).

Tradicionalmente, agentes antimicrobianos son adicionados directamente a los alimentos, pero su actividad puede ser inhibida por diferentes sustancias que forman parte del alimento, de manera que puede disminuir su eficiencia. En tales casos, la implementación de RC puede ser más eficiente que los aditivos tradicionales, por requerirse menor concentración de antimicrobiano para obtener el mismo efecto (Oms-Oliu et al., 2008; Ouattar et al., 2000).

Los mecanismos de transporte para suministrar sustancias bioactivas deben cumplir ciertos criterios (Robinson et al., 2009):

- Proteger el nutriente del entorno externo (oxígeno, luz, temperatura, pH o agua).
- No deben interferir en la percepción sensorial del consumidor.
- Una liberación adecuada del nutriente en el tracto gastrointestinal de manera que puede absorberse.
- Los materiales comestibles utilizados deben estar contemplados en la legislación.

En los alimentos no sólo la estabilidad microbiológica juega un papel indispensable en la calidad, sino también aspectos como el sensorial son indispensables para lograr que la aplicación de tecnologías emergentes como los RC llegue a ser exitosa. Marcuzzo et al., (2010) implementó la encapsulación de compuestos aromáticos como posible estrategia para reducir las reacciones degradantes como la oxidación.

El uso de nanotecnología para el desarrollo de RC como método para encapsular, proteger i difundir ingredientes lipofílicos activos a los alimentos, está emergiendo como una herramienta potencial para diseñar nuevos productos alimentarios con una funcionalidad óptima (Rojas-Graü et al., 2009).

2.3. NANOTECNOLOGÍA y NANOEMULSIONES

2.3.1. Nanotecnología

La nanotecnología es una área emergente de la ciencia que estudia aquellos materiales y elementos de muy pequeñas dimensiones, de rango nanométrico. Las aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria son relativamente recientes, si se compara con otras áreas. No obstante, es una industria en expansión. Según el ObservatoryNANO (2009), actualmente hay más de 400 empresas a nivel mundial, las cuales se centran en investigar este sector.

En la producción de alimentos se identifican cuatro grandes áreas que pueden beneficiarse de la nanotecnología: desarrollo de nuevos productos funcionales, procesado de alimentos a una escala micro y nanométrica, desarrollo de productos y diseño de instrumentos y métodos para mejorar la seguridad alimentaria y bioseguridad (AESAN, 2009).

En un futuro, se espera que la aplicación de la nanotecnología en la industria alimentaria consiga metas como reducir el consumo de grasas, crear nuevos sabores y texturas, mejorar la absorción de nutrientes y el envasado de alimentos. A corto plazo sin embargo, se destaca el diseño de nanomateriales de contacto con los alimentos; mientras que a largo plazo, la industria se puede expandir hacia el desarrollo de nuevos ingredientes alimentarios y nutrientes nanoencapsulados (AESAN, 2009). De todas formas, su uso en alimentos sólidos tiene un largo recorrido por delante, pues aún supone un reto inmovilizar las nano-gotas en estas superficies. No obstante, los RC a base de nanoemulsiones representan una técnica efectiva para conseguir productos mínimamente procesados.

Los RC usados en la industria alimentaria deben ser ante todo, seguros para la salud humana; deberían minimizar (sino evitar) el crecimiento de biofilm contaminante; y finalmente ser perdurables. Se ha determinado, recientemente, que las nanoemulsiones aplicables a superficies, pueden controlar la adhesión de biomoléculas, y por tanto, de microorganismos (Robinson, Nanotechnology, and Mark Morrison 2009; Salvia-Trujillo et al., 2013). Además, reduciendo el tamaño de las partículas del RC podemos conseguir un producto estable y seguro para la salud humana y permite encapsular compuestos bioactivos, aumentado su absorción y biodisponibilidad. La nanotecnología permite mejorar la incorporación a la matriz alimentaria

de compuestos hidrófobos, insolubles en agua, sensibles a la luz, al oxígeno o temperatura (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos nutrientes con dificultades de incorporación en los alimentos funcionales (Adaptación de: Observatory Nano y Commission 2009).

Nutriente	Fuente	Beneficios	Causas de mala incorporación
Carotenoides	Frutas y verduras	Disminuyen el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas.	Hidrófobos, susceptibles a la luz, el oxígeno y se auto-oxidan.
Vitamina E	Aceites vegetales como el de maíz, soja, germen de trigo, margarina e hígado	Disminuye el riesgo de enfermedades coronarias, degenerativas y cáncer. Puede ayudar a retrasar el inicio de DM2 y mejorar el perfil glucémico.	Condicionada a las reservas lipídicas del organismo, susceptible a la oxidación.
Ácidos grasos Omega-3	Pescados, nueces, huevo, aceites de pescado, de oliva y vegetales	Disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, desórdenes inmunitarios y cáncer y aumenta la agudeza mental.	Hidrófobos y extremadamente susceptibles a la oxidación.
Fitoesteroles	Todas las plantas, sobretodo cereales	Disminuyen la absorción del colesterol y como resultado ofrece protección contra enfermedades cardiovasculares.	Hidrófobos, tienen un alto punto de fusión y tendencia para formar cristales insolubles, por lo que su inclusión en soluciones acuosas es difícil.
Minerales		Componentes clave de procesos metabólicos	Pueden reaccionar con otros productos, afectar al sabor y decolorar alimentos.

2.3.2. Nanoemulsiones

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) determina que en una emulsión debe haber gotas líquidas o cristales líquidos dispersos en una fase líquida (Gutiérrez et al., 2008); consecuentemente, las nanoemulsiones (NE) de aceite-en-agua se componen por nanogotas lipídicas, entre 20-600nm, (Bouchemal et al., 2004; Weiss et al., 2006) dispersas en una solución acuosa con unas características funcionales y fisicoquímicas únicas.

Por un lado, las nanoemulsiones presentan mayor resistencia a fenómenos desestabilizantes y de coalescencia (Gutiérrez et al., 2008; McClements 2010). Además, las gotas nanométricas pueden proporcionar productos transparentes o ligeramente turbios, permitiendo su uso en bebidas y alimentos específicos (Salvia-Trujillo et al., 2015). Por el otro lado, se ha destacado recientemente la capacidad de las nanoemulsiones para transportar ingredientes activos a través de las membranas biológicas y conseguir una mayor biodisponibilidad de componentes bioactivos específicos (Acosta, 2009).

La solubilización de compuestos hidrofóbicos a través de nanoemulsiones ha demostrado ser una técnica eficaz para la liberación de fármacos. La reducción del diámetro de gota de los compuestos hidrófobos, optimiza la mezcla de las distintas fases e implica un incremento de su superficie activa, viéndose incrementada su funcionalidad.

Datos experimentales sugieren que RC basados en nanoemulsiones de un 1% (v/v) en aceites esenciales, presentaron tanto mayor inactivación de *E. Coli*, como menor crecimiento bacteriano en manzanas frescas cortadas durante su almacenamiento, comparado con RC a base de emulsiones convencionales a la misma concentración (Salvia-Trujillo et al., 2015).

Las nanoemulsiones incluyen una fase lipídica y una fase acuosa, al mismo tiempo, es habitual el uso de biopolímeros como surfactantes y texturizantes.

2.3.2.1. Fase lipídica

La fase lipídica es la fase dispersa en una fase acuosa continua. En nanoemulsiones aceite-en-agua, generalmente actúa como portador de compuestos activos lipofílicos. Su formulación puede contar con compuestos no polares, tales como triglicéridos, aceites minerales o aceites esenciales (Qian y McClements 2011). Las características fisicoquímicas del aceite determinan la formación de emulsiones y nanoemulsiones, así pues, se ha descrito que cuanto más baja es la viscosidad del aceite, menor será el tamaño de las gotas de las nanoemulsiones (Qian y McClements 2011; Wooster et al., 2008).

La alta viscosidad del aceite de maíz puede que sea contraproducente para el diseño de recubrimientos lipídicos de tamaño de partícula nanométrica (Qian et al., 2012; Yang et al., 2015). Y es que los aceites que son ricos en ácidos grasos de cadena larga (aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de maní, aceite de canola, aceites de pescado, etc.), son más viscosos y dificultan la rotura en nanopartículas porque abandonan la zona de máxima rotura con mayor facilidad (Qian y McClements 2011; Wooster, Golding, y Sanguansri 2008)

Cabe mencionar que el tamaño de las gotas de aceite, presentes en la NE, debe ser el adecuado para resistir fenómenos desestabilizantes como la madurez de Ostwald y las fuerzas

de movimiento de Brownian. Es decir, un diámetro excesivamente grande o demasiado pequeño podrían forzar la separación de fases de la NE.

2.3.2.2. Fase acuosa

De igual modo que la fase lipídica; la fase acuosa de las emulsiones de aceite-en-agua influye en las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones. La fase acuosa puede contener componentes solubles en agua como minerales, ácidos, bases, saborizantes, conservantes, vitaminas, azúcares, tensioactivos, proteínas o polisacáridos (McClements. 2004).

2.3.2.3. Surfactantes

El surfactante añadido en la composición de nanoemulsiones previene las nuevas gotas creadas contra fenómenos de coalescencia y difusión molecular (Wooster et al., 2008).

La lecitina o fosfatidilcolina es la unión lipídica formada por una colina, un fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos, en general un ácido graso saturado y uno insaturado. También forma parte de las sales biliares y evita que las gotas lipídicas se reagrupen. Figueroa (2013) y Figueroa et al., (2011) introdujeron la lecitina en la composición de un RC que consiguió extender la vida útil de mango zapote.

Por otro lado, el Tween 20 es un detergente no iónico, de un color amarillento, ampliamente utilizado en aplicaciones bioquímicas y también como agente emulsionante en la preparación de emulsiones estables de aceite-en-agua (McClements et al., 2010; Qian et al., 2012).

Algunos autores han desarrollado estudios sobre la caracterización y estabilidad de las nanoemulsiones comparando la acción de distintos surfactante; por ejemplo Bouchemal et al., (2004) comparó la influencia de diferentes surfactantes (Puloronic F68 y Tween 80 y 20). . Resultó que las nanoemulsiones preparadas con Tween 20 tenían el tamaño de partícula más pequeña y la curva una distribución de tamaño más homogénea, comparado con otros emulsionantes comercializados. Qian y McClements (2011) concluyeron que los surfactantes tipo Tween 20 y dodecilsulfato sódico (SDS) podían producir nanopartículas de menor tamaño que los biopolímeros β -lactoglobulina y caseína.

2.3.2.4. Espesante

La adición de un biopolímero en la fase acuosa, pretende un aumento de su viscosidad, y consigue disminuir el movimiento browniano de las nano-gotas; obteniéndose una emulsión más estable. Además, el alginato sódico ha sido ampliamente usado como base de los RC a base

de nanoemulsiones (Oms-Oliu et al., 2008; Remminghorst y Rehm 2009; Salvia-Trujillo et al., 2013; Yanine 2012) .

3. JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés por la incorporación de compuestos bioactivos en los alimentos debido a los efectos beneficiosos potenciales para la salud.

En nuestro caso, el diseño de RC que incorporan nanopartículas de aceite enriquecido en β -caroteno y α -tocoferol, persigue el objetivo de añadir valor nutricional y funcional a alimentos de gran consumo y fácil acceso. Además, el RC aporta ácidos grasos insaturados procedentes del aceite vegetal, que se incorporan a las membranas celulares confiriéndoles mayor funcionalidad.

La incorporación de β -caroteno y α -tocoferol en los RC podría reducir la oxidación de las membranas celulares de nuestro organismo debido al poder antioxidante de estos compuestos. La capacidad antioxidante de estos dos componentes protege, en su conjunto, la funcionalidad celular gracias a su acción contra radicales libres y especies reactivas de oxígeno, es decir, pueden tener un efecto protector contra el envejecimiento celular. Además, su encapsulación en nanopartículas y su posterior incorporación en un RC podría aumentar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad; pues se ha descrito que las nanoemulsiones favorecen la absorción y incorporación de compuestos liposolubles en nuestro organismo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

El objetivo general del presente estudio es determinar la bioaccesibilidad de sustancias activas incorporadas en recubrimientos comestibles conteniendo nanopartículas lipídicas. Se pretende mejorar el contenido y la bioaccesibilidad de β -caroteno y α -tocoferol en diferentes matrices alimentarias (pera *Conference*, jamón de pavo y queso bajo en grasa).

4.2. Objetivos específicos

- Elaborar nanoemulsiones enriquecidas con β -caroteno y α -tocoferol que sean estables y capaces de actuar como medio de enriquecimiento de matrices alimentarias pobres en estas sustancias bioactivas.
- Determinar las propiedades fisico-químicas de las nanoemulsiones.
- Establecer la formulación y las condiciones de procesado más adecuadas para obtener nanoemulsiones y evaluar su aplicabilidad como RC de matrices alimentarias pobres en sustancias bioactivas.
- Evaluar la digestibilidad y bioaccesibilidad *in vitro* de las sustancias activas incorporadas en los recubrimientos comestibles.

5. MATERIAL y MÉTODOS

5.1. MATERIAL

Las matrices alimentarias escogidas para su recubrimiento fueron: pera *Conference* (mercado local), queso bajo en grasa (18%) (Cadí S.C.C. Ltda, Cataluña, España) y fiambre de pavo (Grupo Alimentario Argal S.A., Cataluña, España).

Las emulsiones se prepararon a partir de seis componentes: una fase lipídica con aceite de maíz (Koipesol, Deoleo S.A. Madrid, España) enriquecido con β -caroteno y α -tocoferol (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EEUU), una fase acuosa con agua milli-Q (Millipore Corporation, Massachusetts, EEUU), alginato sódico (AS) (FMC BioPolymer, Sadvika, Noruega), Tween 20 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EEUU), lecitina refinada (Alfa Aesar, Massachusetts, EEUU) y fibra de mandarina (Indulleida S.A., Cataluña, España).

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Elaboración del aceite enriquecido

Las nanoemulsiones se prepararon a partir de aceite de germen de maíz, como se especifica en la Tabla 2. El aceite de maíz se enriqueció con β -caroteno y α -tocoferol (0,25% y 0,25%) a través de sonicación (1 min) y calentamiento suave (<50 °C durante 5min) para asegurar la solubilización completa.

Tabla 2. Composición del aceite enriquecido (%).

COMPONENTE	PORCENTAGE (%)
β -caroteno	0,25
α -tocoferol	0,25
aceite de germen de maíz refinado	98,5

5.2.2. Preparación de nanoemulsiones

5.2.2.1. Preparación de emulsiones convencionales

La composición de las emulsiones convencionales se presenta en la Tabla 2. En primer lugar, se preparó la fase acuosa disolviendo el AS (2% w/v) en agua caliente (80 °C); se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) y se añadió fibra de mandarina (0,5% w/v) con un

mezclador de alta velocidad (Ultra-Turrax, Janke y Kunkel, Staufen, Alemania) a 9.500 rpm durante 5 min.

Las emulsiones convencionales se prepararon mezclando el aceite de maíz enriquecido previamente con la solución de AS o pectina, y los surfactantes Tween 20 y lecitina (Tabla 3). La solución final se mezcló utilizando un mezclador de alta velocidad (Ultra-Turrax, Janke y Kunkel, Staufen, Alemania) durante 3 min a 9.500 rpm.

Tabla 3. Composición de la emulsión convencional.

COMPONENTE	PORCENTAGE (%)
Alginato sódico o Pectina	2
Fibra de mandarina	0,5
Aceite refinado de germen de maíz enriquecido con β -caroteno y α -tocoferol	4
Tween 20	1
Lecitina refinada	1

5.2.2.2. Formación de nanoemulsiones

Las emulsiones convencionales se sometieron a las altas presiones del microfluidizador (M110P, Microfluidics, Massachusetts, EEUU). El microfluidizador aplicó presiones de 150MPa para reducir el tamaño de partícula de la emulsión convencional (EC) hasta un tamaño nanométrico. La emulsión primaria fue bombeada a través de una válvula de resistencia consiguiendo así, partículas muy finas por acción del estrés y las fuerzas de cizalla. Las nuevas partículas nanométricas circularon por un serpentín de enfriamiento ubicado al exterior de la cámara de interacción sumergido en agua helada para evitar temperaturas superiores a 20°C. Fueron necesarios cinco ciclos para conseguir un tamaño nanométrico óptimo.

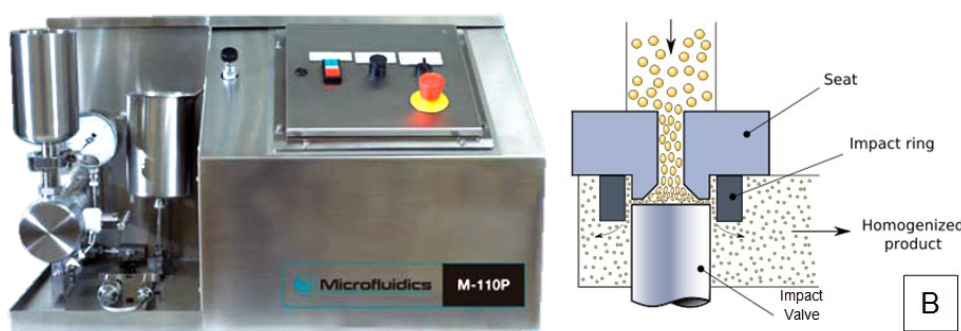


Figura 1. Izquierda: M110P microfluidics; derecha: mecanismo de nanoproducción.

5.2.3. Aplicación de la nanoemulsión como recubrimiento comestible

Las peras se lavaron con una solución de hipoclorito sódico (1 %) y aclaradas con agua corriente. El exceso de agua se retiró con papel absorbente, antes de empezar con el procesado. La pera y del queso bajo en grasa se cortaron en cilindros (1,5 cm de diámetro por 2 cm de altura), mientras que las lonchas de fiambre de pavo (previamente envasadas al vacío) se cortaron en láminas de 2 cm de altura por 4,5 cm de ancho.

La NE se aplicó sumergiendo la matriz durante 2 min. Después de 1 min de secado/escurreo, se bañó la matriz en la solución de CaCl_2 al 2 % 2 min y se secó/escurreo 1 min. A esta solución se añadió ácido ascórbico al 1% para los trozos de pera. Se estableció un protocolo de doble pesada para determinar la cantidad de RC que se había incorporado en la matriz, por lo que la matriz se pesó antes y después de la aplicación del RC.

Un total de 100 g de matriz alimentaria recubierta se destinó al análisis del producto.

5.2.4. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión

Se caracterizó la NE utilizada para el RC. Se caracterizaron las tres nanoemulsiones aplicadas a cada matriz alimentaria (pera *Conference*, jamón de pavo y queso bajo en grasa), y las determinaciones de cada nanoemulsión se llevaron a cabo por triplicado. Las determinaciones fueron las siguientes: tamaño de partícula e índice de polidispersión, carga eléctrica, viscosidad y color.

5.2.4.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersión

El tamaño medio de partícula e índice de polidispersión de las nanoemulsiones se determinó mediante dispersión de luz dinámica DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK, Figura 2). La medición se realizó a un ángulo de lectura fijo de 90° con muestras diluidas (1:10). Mediante la dispersión de luz dinámica (DLS) se determinó el movimiento de las gotas de tamaño nanométrico y se relacionó con el diámetro hidrodinámico basándose en la ecuación de *Stokes-Einstein*.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

El diámetro de las partículas fue referido como el diámetro medio ponderado de superficie y la distribución de tamaño de partículas, por el índice de polidispersión (PDI); agrupándose gráficamente los distintos grupos por tamaño de partícula, expresado en nm.

El tamaño de partícula de las emulsiones convencionales se determinó mediante dispersión de luz estática (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Las muestras se diluyeron (1:10). Los resultados se expresaron como la superficie de diámetro medio ponderado. Para determinar el tamaño de partícula se realizaron tres mediciones de la EC.

5.2.4.2. Carga eléctrica

Las propiedades eléctricas de las gotas se describen en términos de potencial eléctrico de superficie, densidad de carga de superficie y/o potencial ζ . El potencial ζ define la movilidad electroforética de las gotas para determinar su carga superficial; esta carga debe hallarse fuera del intervalo ± 30 mV, indicando que las fuerzas de repulsión entre las nanopartículas son suficientes para evitar la coalescencia y son favorables para mantener la estabilidad de la emulsión.

El potencial ζ resulta una de las mejores representaciones de la carga eléctrica de una emulsión, porque tiene en cuenta la totalidad de iones contrarios presentes. Además se trata de una medida fácil de obtener, por lo que es habitual la caracterización de emulsiones a través del potencial ζ (McClements, et al., 2007). La carga eléctrica (potencial ζ) de las muestras se analizó a través de la dispersión de luz (PALS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), midiendo la movilidad electroforética de las gotas.

Las muestras diluidas (1:10) se dispusieron en células capilares equipadas con dos electrodos para evaluar la movilidad electroforética de las partículas. Los resultados se expresaron en mV.



Figura 2. Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK

5.2.4.3. Viscosidad

El SV-10 vibro-viscosímetro (A y D Company, Tokio, Japón) se utilizó para medir la viscosidad de las nanoemulsiones. El dispositivo aplicó una vibración de 30Hz de amplitud constante, midiendo la susceptibilidad a la deformación de la muestra. Los resultados se expresaron en mPas por °C.

5.2.4.4. Color

El color de las nanoemulsiones se midió a través del colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón) a temperatura ambiente, mediante el *Iluminante* D65 y un ángulo del observador de 10 °C . Los valores se expresaron en forma de coordenadas L^* , a^* y b^* (Figura 2) representando los colores del CIELab :

- Eje perpendicular al plano (L^*): luminosidad (luz-oscuridad).
- Eje abscisa (a^*): posición entre verde y rojo. Los valores negativos indican color verde, mientras que los positivos, indican color rojo.
- Eje ordenada (b^*): posición entre amarillo y azul. Los valores negativos indican color azul, mientras que los positivos, indican color amarillo.

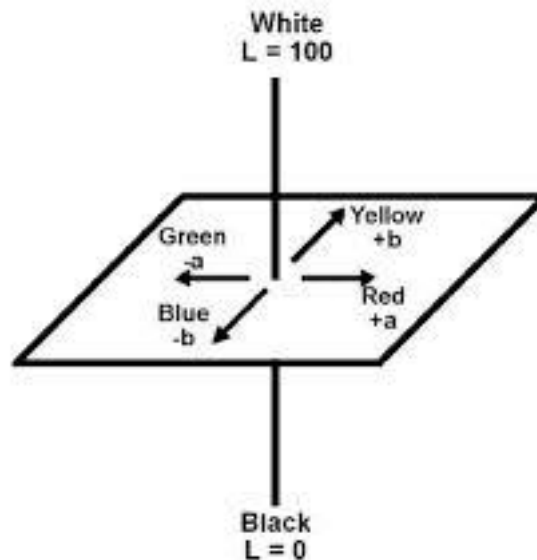


Figura 3. Plano tridimensional de lectura colorimétrica.

5.2.5. Digestión *in vitro* de las distintas matrices alimenticias recubiertas

Tres réplicas de cada alimento se sometieron a un modelo de digestión *in vitro* con el que se simulaban las condiciones de digestión del tracto gastrointestinal (Qian et al., 2012). Dicho método, consistía en someter el alimento a una fase de boca, una fase gástrica y una última fase intestinal.

Fase de boca: Un fluido de saliva simulada (FSS), que contenía mucina (3 %) y diversas sales, se preparó de acuerdo con un estudio anterior (Sarkar et al., 2009). Unos 10 g de muestra se mezclaron con 10 g de FSS, de manera que la mezcla final contenía 2 % (w/w) de aceite. Después la mezcla se ajustó a pH 6,8 y se agitó continuamente a 100 rpm en una incubadora de temperatura controlada (37 °C) durante 10 min.

Fase gástrica: Un fluido gástrico simulado (FGS) se preparó diluyendo una solución de 2 g de NaCl/L y HCl al 37% y ajustando el pH a 1,2 utilizando HCl 1,0 M (Sarkar et al., 2009). A continuación, el “bolo alimenticio” de la fase de la boca se mezcló con el FGS a una relación de 50:50 (w/w), de modo que la mezcla final contenía 1 % (w/w) de aceite. Después, la mezcla se ajustó a pH 2,5 usando NaOH 1M y se incubó con agitación continua a 100 rpm y 37 °C, durante 2h.

Fase de intestino delgado: Para simular las condiciones del intestino delgado se usó una estación monitorizada de pH (Metrohm EE.UU. Inc.) de acuerdo con McClements y Li (2010). Una alícuota de la muestra se colocó en un baño a temperatura controlada (37 °C) ajustando a pH 7,0 con una solución de NaOH. A continuación 9,3 mL de extracto de bilis (46,87 mg/mL) y 1 mL de cloruro cálcico (110 mg/ mL) disueltos en soluciones tampón de fosfato se añadieron a la muestra, reajustándola a pH 7,0. Después se añadió 2,5 mL de suspensión de lipasa, recién preparada (24 mg/mL). El pH de la mezcla se monitorizó registrando el volumen gastado de NaOH 0,25 M (mL) necesario para neutralizar los ácidos grasos libres (AGL) liberados por la digestión lipídica durante 2h.

La cantidad de AGL liberados se calculó a partir de la siguiente ecuación (McClements y Li 2010):

$$AGL(\%) = 100 \times \frac{V_{NaOH} \cdot C_{NaOH} \cdot M_{aceite}}{2 \cdot m_{aceite}} \quad (2)$$

donde V_{NaOH} es el volumen de la solución de NaOH necesaria para neutralizar los ácidos grasos libres liberados durante el tiempo de digestión, C_{NaOH} es la molaridad de la solución de NaOH (0,25 M), M_{aceite} es el peso molecular del aceite (g /mol) y m_{aceite} es el peso de aceite inicialmente presente en cada célula de incubación (g). El peso molecular del aceite de maíz se consideró de 800 g /mol.

5.2.6. Determinación de la bioaccesibilidad de β -caroteno

Después de la digestión *in vitro*, la muestra se centrifugó (Centrífuga CL10, Thermo Scientific) a 4000 rpm durante 40 min a 4 °C. Se obtuvo una muestra separada en dos fases, una sedimentada y opaca en la parte inferior y una fase micelar clara en el medio (ocasionalmente se obtuvo una fase oleosa o crema en la parte superior que fue despreciada). A partir de la fase intermedia se recuperó el β -caroteno de las micelas mixtas y se calculó la bioaccesibilidad.

Para determinar el contenido de β -caroteno de las muestras, se añadieron a 5 mL de la muestra micelar, 5 mL de cloroformo y se centrifugó a 12.500 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante espumoso de la muestra y se midió la absorbancia de la fase acuosa a 450 nm usando un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 3000 pro, Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, Cambridge, UK).

La bioaccesibilidad del β -caroteno se determinó a partir de la fracción micelar y el alimento, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad(\%)} = 100 \times \frac{[C.\text{micela}]}{[C.\text{inicial}]} \quad (3)$$

donde *C. micela* es el contenido de β -caroteno en la fracción micelar, y *C. inicial*, es el contenido de β -caroteno del alimento antes de someterse a proceso digestivo.

5.2.7. Determinación de la bioaccesibilidad de α -tocoferol

El contenido en α -tocoferol fue determinado con una variación el método HPLC descrito por Plaza et al., 2013). Unos 15g de muestra se homogeneizaron inmediatamente con una mezcla de n-hexano/metanol (60:40 v/v) que contenía 5 g/ kg de butil-hidroxitolueno (BHT) a 12.500 rpm durante 10 min a 4 °C. La suspensión resultante se filtró y secó en condiciones de vacío con sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó hasta la sequedad usando un rotor evaporador a 35°C. Al residuo obtenido en la extracción, se le añadieron 0,5 g de ácido ascórbico, 20 ml de metanol y 5 ml de hidróxido de potasio saturado. La mezcla se saponificó por reflujo de N₂ durante 30 min. El α -tocoferol se extrajo con n-hexano en un embudo de separación. Mientras el α -tocoferol quedaba en la parte superior del embudo, la porción inferior de hexano se despreció; se usó agua Milli Q para separar de igual forma, el hidróxido de potasio saturado del α -tocoferol. Finalmente, el solvente fue evaporado hasta la sequedad en un rotor evaporador a temperatura de 35°C.

El residuo resultante se solubilizó con 4 ml de n-hexano para su posterior análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de la vitamina E se llevó a cabo mediante la inyección de 20 μ l de alícuota. Una columna de fase inversa C₁₈ (Hypersil ODS, 5

μl partículas esféricas, 250x4,6 mm i.d.) (Technochroma, Barcelona, España) se eluyó isocráticamente con una mezcla de metanol/agua (94: 4, v / v) a un caudal de 1,0 ml min⁻¹. Las muestras se monitorizaron con el detector de fluorescencia (Hewlett-Packard, mod. HP-1046A) (Palo Alto, CA, EE.UU.) a una longitud de onda de excitación de λ= 296 nm y una longitud de onda de emisión de λ=340 nm. La duración del análisis cromatográfico fue de unos 25 min.

$$\text{Bioaccesibilidad(\%)} = 100 \times \frac{[\text{C.micela}]}{[\text{C.incial}]} \quad (4)$$

5.2.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Statgraphics Plus v.5.1. para Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, Md). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de los datos obtenidos a un nivel de significación del 95%. A su vez se llevaron a cabo pruebas de rango múltiple para identificar diferencias significativas entre las medias obtenidas, siguiendo el criterio de la mínima diferencia significativa (Least Significant Difference-LSD).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudio preliminar sobre la aplicabilidad de nanoemulsiones como recubrimientos comestibles

Se realizó un estudio preliminar para optimizar la aplicabilidad de la NE como recubrimiento comestible de pera *Conference* fresca cortada (PC), jamón de pavo (JP) y queso bajo en grasa (QBG). Como puede verse en la Tabla 4, se experimentó con pectinas de distintos grados de metoxilo y AS.

Se preparó un primer recubrimiento a base de pectina de alto nivel de metoxilo, el cual no se adhirió correctamente a la matriz alimentaria aún sumergiéndolo en una solución de cloruro sódico de hasta el 5%. Un pegado ineficiente supuso por un lado, pérdida de NE a su contacto con el recipiente contenedor y por el otro, un tiempo de secado superior que aumentaba el tiempo de exposición del producto a microorganismos contaminantes. Por tanto, la pectina de alto nivel de metoxilo se descartó para su uso como recubrimiento comestible.

Del mismo modo, se estudió el uso de pectina de menor nivel de metoxilo. Aunque pareció que mejoraba la fijación del recubrimiento, no se obtuvieron resultados favorables para todas las matrices alimentarias. Mientras que el QBG quedó recubierto de forma uniforme en un menor tiempo; en PC y JP, especialmente, no se consiguió una buena fijación.

Tabla 4. Efectos de diferentes espesantes en la formación del recubrimiento comestible.

ESPESANTE	OBSERVACIÓN
Pectina alto metoxilo	Tiempo de secado: >20min (peligro microbiológico) Aspecto: el RC no forma una capa uniforme ni homogénea en ninguna de las matrices alimentarias.
Pectina bajo metoxilo	Tiempo de secado : >10min (peligro microbiológico) Aspecto: el RC solo forma una capa uniforme homogénea en QBG.
Alginato sódico	Tiempo de secado : <2min Aspecto: el RC forma una capa uniforme y homogénea en QBG, JP y PC.

Las interacciones establecidas entre las cadenas de pectina parecen ser responsables de la textura característica de los geles (Rivera, 2008). Como hemos visto, las pectinas se pueden dividir en dos grupos estructurales: pectinas de alto metoxilo (HMO), con un grado de metoxilación de más del 50%, y pectinas de bajo metoxilo (LMP), con grado de metoxilación menor del 50% (May, 1997). Las interacciones establecidas entre las cadenas de pectina parecen ser responsables de la textura característica de los geles (Rivera, 2008). Las cadenas y metoxilación de las LMP, entre otros factores intrínsecos, les permite unirse en mayor grado a los iones calcio y consecuentemente formar un gel semisólido en menor tiempo que las HMO (Ortuño, 1999).

Finalmente se realizó una prueba con un tercer espesante, el AS. La incorporación de un hidrocoloide, permitió desarrollar un recubrimiento comestible con un menor tiempo de secado de aspecto homogéneo y uniforme (Tabla 4). Los RC a base de AS han demostrado ser capaces de transportar ingredientes activos para su uso en alimentos coincidiendo con Tapia et al., (2007).

6.2. Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión

Se estudiaron las características fisicoquímicas de una NE a base de alginato sódico (NE) en comparación con una EC para su uso como recubrimiento comestible en alimentos.

6.2.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Se evaluó el tamaño de partícula e índice de polidispersión (Pdl) de la EC y NE. Como se observa en la Tabla 5, el tamaño de partícula medio de la EC fue de 52,53 μm ($\pm 11,3$), que disminuyó más de un 98% ($p \leq 0,05$) hasta los 392,02 nm ($\pm 5,1$). La importante reducción de tamaño de partícula se consiguió a través de un proceso de microfluidización; coincidiendo con los estudios de formación de nanoemulsiones de Solans et al., (2005), Gutiérrez et al., (2008), Yuan et al., (2008), Qian y McClements (2011) y Gadhav (2014). La reducción de tamaño aumenta la estabilidad de las emulsiones debido a la disminución de las fuerzas de floculación, coalescencia y separación de fases, así como mejora las características fisicoquímicas y apariencia (McClements, 2012; Sarkar et al., 2009).

Tabla 5. Efecto del proceso de microfluidización en la disminución de tamaño de partícula.

	EC	NE
Tamaño de partícula	52,53 μm ($\pm 11,3$)	392,02 nm ($\pm 5,1$)
Índice de polidispersión	0,74 ($\pm 0,1$)	0,37 ($\pm 0,01$)

En cuanto a los valores del índice de Pld de la EC y la NE se observó una reducción de los valores de un 50% en la NE respecto de la EC ($p \leq 0,05$) después de la microfluidización llegando a ser próximos a cero como puede verse en la Tabla 5. Valores de Pld próximos a cero, como en nuestro caso, indicaron mayor homogeneidad de las nanoemulsiones (Salvia y Trujillo et al., 2015). Las Figuras 5 y 6 muestran la distribución de tamaño de partícula de la EC y de la NE, respectivamente. Se obtuvo un perfil más homogéneo en la NE, pudiéndose ver un único pico de dispersión; por el contrario la EC mostró una distribución de partículas dispersa y desigual.

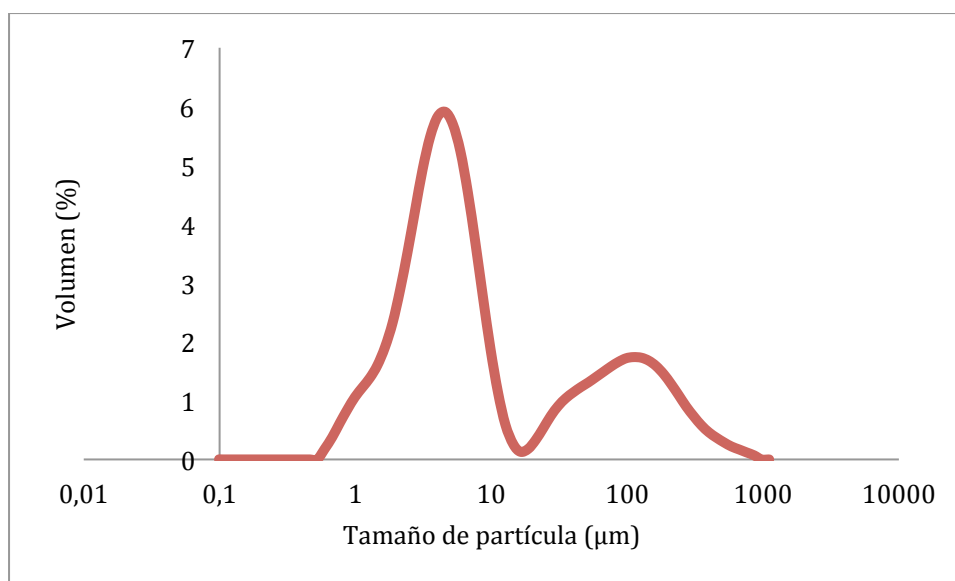


Figura 4. Perfil de dispersión de tamaño de partículas de la emulsión convencional (EC).

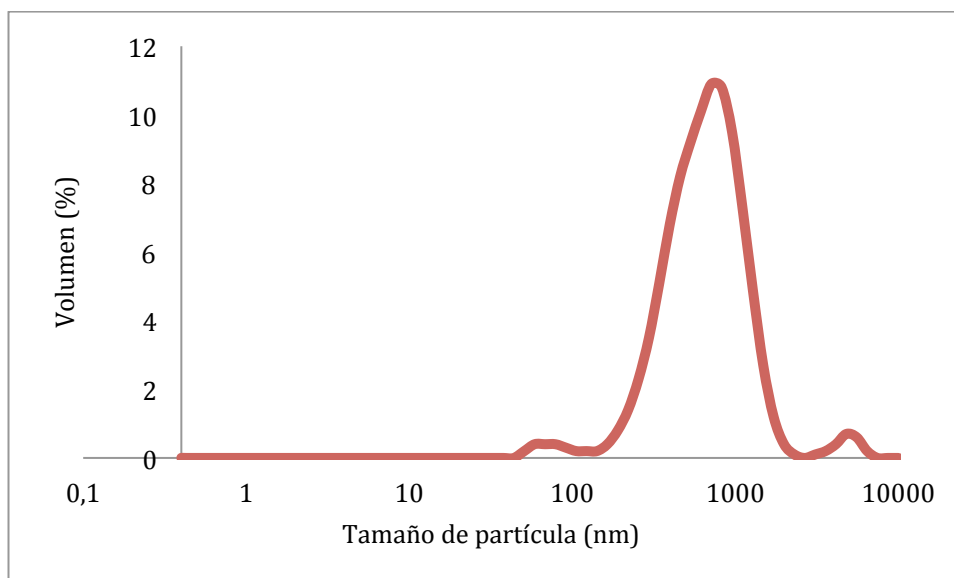


Figura 5. Perfil de dispersión de tamaño de partículas de la nanoemulsión (NE).

6.2.2. Potencial z

Como se puede observar en la Figura 7, el potencial z de las nanoemulsiones se mantuvo siempre negativo; con valores de -68,2 mV en la EC y -65,82 mV en la NE. De este modo, las cargas eléctricas interfaciales de la EC y NE fueron parecidas ($p > 0,05$), por lo que se descartó el efecto del proceso de microfluidización sobre la carga eléctrica de las nanoemulsiones.

EC y NE presentaron potenciales z que quedaron fuera del intervalo ± 30 mV, es decir, la carga eléctrica de las partículas permaneció estable tras el proceso de microfluidización. Esto fue posible, por un lado, a la presencia de surfactante (Tween 20) que confirió grupos negativamente cargados a la interfase de las gotas de aceite, otorgándoles cargas eléctricas estables (Qian et al., 2012; Wooster et al., 2008; Yuan et al., 2008), y por el otro, por el medio estable que concilió el alginato sódico, quien salvó las fuerzas de coalescencia entre nanopartículas y evitó que se agruparan formando gotas de mayor tamaño (Salvia-Trujillo et al., 2013).

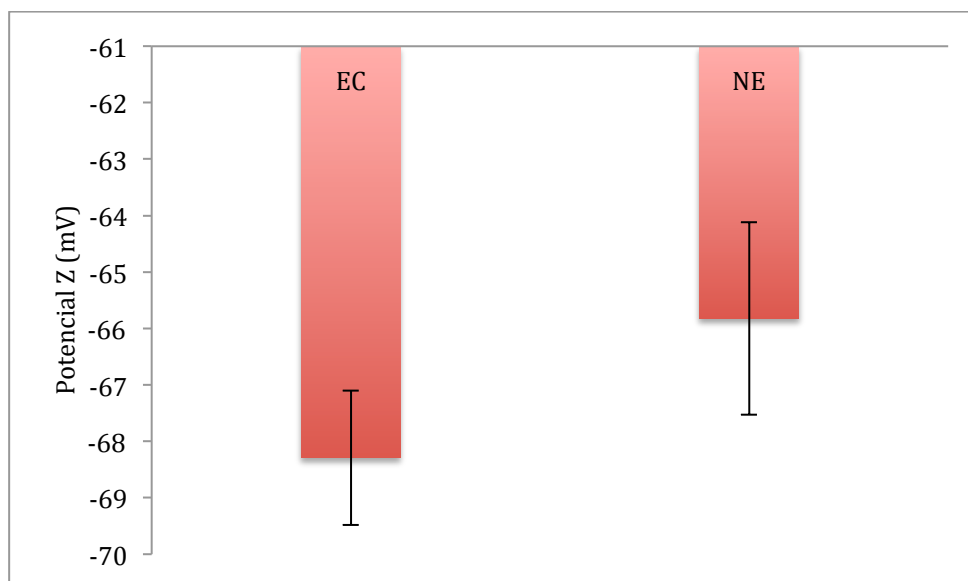


Figura 6. Potencial z de la emulsión convencional (EC) y nanoemulsión (NE).

6.2.3. Viscosidad

Como se aprecia en la Figura 8, la viscosidad de la NE aumentó un 64,5 % tras el proceso de microfluidización ($p \leq 0,05$); con valores en la EC de 197,9 m.Pa ($\pm 24,32$) y de 558,11 m.Pa ($\pm 57,05$) en la NE. Innocente et al., (2009) observó una viscosidad menor en una NE a base de serum de caseína ultrafiltrado, tras el proceso de microfluidización. Lo justificó con la deformación de los agregados proteicos por las fuertes fuerzas hidrodinámicas y velocidad de cizallamiento. También se ha descrito que las gotas de aceite más viscosos, como el aceite de maíz usado, son más difíciles de romper en nanopartículas con un homogeneizador porque puede que abandonen la zona de turbulencias antes de poder ser deformadas por las fuerzas hidrodinámicas (Qian y McClements 2011). Contrariamente, la NE obtenida en nuestro laboratorio consiguió mayor viscosidad tras el proceso de microfluidización coincidiendo con Salvia-Trujillo et al., (2103) o Alegre, (2014). El aumento de la viscosidad en nuestra NE se atribuyó a la presencia de alginato sódico como texturizante, pues en Salvia-Trujillo et al., (2103) y Alegre, (2014) se observó un incremento remarcable de la viscosidad al aumentar la proporción de alginato sódico en la composición de las nanoemulsiones.

Como se ha comentado anteriormente, el poder gelificante del alginato sódico favorece la estabilidad de las nanopartículas y de acuerdo con Wooster et al., (2008), una viscosidad mayor puede estabilizar las gotas de aceite que encapsulan compuestos bioactivos.

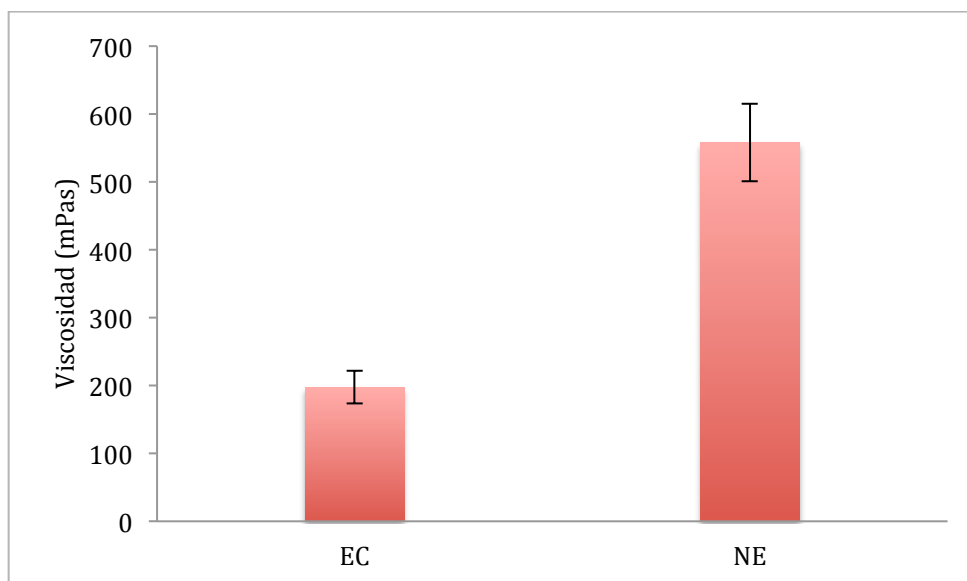


Figura 7. Viscosidad de la emulsión convencional (EC) y nanoemulsión (NE).

6.2.4. Color

El color es importante en el desarrollo de nuevos productos, pues condiciona su posterior comercialización. En nuestro estudio se analizó las coordenadas L^* , a^* y b^* en el espacio de color CIELAB.

Se ha visto en otros estudios que la luminosidad de NE tiende a aumentar con el aumento de tamaño de partícula, pues las partículas de mayor dimensiones disiparon la luz con más intensidad (Salvia-Trujillo et al., 2013) y (McClements 2011). En cambio, el análisis estadístico de nuestro estudio rebeló diferencias estadísticamente significativas entre la luminosidad de EC y NE. Como puede observarse en la Tabla 6, el proceso de microfluidización incrementó un 15,20% los valores de L^* de NE, coincidiendo con los resultados descritos por Salvia-Trujillo et al., (2015). La luminosidad de las nanoemulsiones tiende a ser significativamente mayor ($p \leq 0,05$) a medida que disminuye el tamaño de partícula (Gadhav, 2014; McClements et al., 2011; Trujillo et al., 2015).

Tabla 6. Valores de color de las emulsiones convencional y nanoemulsión.

	Emulsión Convencional	Nanoemulsión	%
L^*	58,20 ($\pm 3,89$)	67,05 ($\pm 57,05$)	↑ 15,20*
a^*	1,97 ($\pm 1,22$)	1,69 ($\pm 0,18$)	↓ 14,04
b^*	42,62 ($\pm 7,34$)	42,64 ($\pm 0,86$)	↑ 0,05

Nuestros resultados son difíciles de comparar, pues existen pocos estudios publicados que tengan en cuenta las características de coloración de NE enriquecidas con β -caroteno para poder resultados.

6.3. Digestibilidad *in vitro* de las sustancias activas incorporadas en los recubrimientos comestibles.

La digestión *in vitro* se llevó a cabo en las matrices alimentarias PC, JP y QBG recubiertas con la NE enriquecida en beta-caroteno y vitamina E. La digestión se valoró a través del porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) liberados durante el proceso de digestión de las matrices alimentarias.

La velocidad y extensión del proceso de digestión se determinaron mediante el método “pH-Stat”, ampliamente usado en la investigación alimentaria y farmacéutica con este propósito (Alegre, 2014; Lupiañez, 2014; McClements y Li 2010b; Qian et al., 2012; Yang et al., 2015). Este método relaciona el volumen de NaOH utilizado para mantener un pH 7, con la acidez provocada por la liberación de dichos AGL; asumiendo que se liberan un máximo de dos AGLs por cada molécula de triglicérido. El volumen de NaOH se registró durante el tiempo de digestión (Figura 9), observándose la rapidez de digestión y el volumen final de NaOH.

Se calculó el porcentaje de AGL liberados durante la digestión *in vitro* de las matrices. Como puede observarse en la Figura 10, la liberación de AGL fue parecida en las tres matrices, el análisis estadístico reveló que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre la cantidad de AGL liberados por las distintas matrices. Se obtuvieron valores de digestibilidad del 39,6% en PC; 30,14% en JP y del 31,69% en el QBG. Estos valores no se pueden comparar porque, hasta el momento, no existen resultados de digestibilidad en alimentos recubiertos con nanoemulsiones, sino del estudio de nanoemulsiones. Aún así, las bajas digestibilidades obtenidas en comparación con la digestibilidad de NE, pueden relacionarse con el contenido de fibra añadida en la composición de la NE, pues se ha descrito que las fibras interaccionan con los ácidos biliares, dificultando el proceso de digestión (Alegre 2010; Beysseriat et al., 2006; Lupiañez 2014). Otra causa de la baja digestibilidad de los RC pudo ser un aumento del diámetro de partícula durante el proceso digestivo debido a la acción de las enzimas digestivas, y a fenómenos de coalescencia dados en partículas lipídicas parcialmente digeridas (Qian et al., 2012; Yang et al., 2015). Reis et al. (2009) observó que la cantidad de AGL liberados, y por tanto la digestibilidad, aumentaba cuanto menor era el tamaño de partícula.

En general, se observó una fase inicial de liberación de AGL de las nanoemulsiones, seguida de una segunda fase de estabilización más larga coincidiendo con los resultados obtenidos por Lupiañez (2014) y Yang et al., (2015). Según este último autor, la lipasa presente

en la fase de digestión intestinal fue capaz de absorberse rápidamente en la superficie de las gotas lipídicas y convertir los triglicéridos encapsulados en AGL y monoglicéridos.

Se pudieron diferenciar dos tendencias de digestión; la PC y el JP recubiertos experimentaron una digestión rápida y de velocidad parecida ($p>0,05$), pues liberaron la mayoría de AGL en menos de 10 min. El tiempo de digestión coincidía con los resultados de estudios anteriores parecidos que observaron mayor facilidad y rapidez de digestión de las nanoemulsiones en comparación con las emulsiones convencionales, que se digerían de forma más gradual (Lupiañez, 2014). Por otro lado, la digestión de QBG recubierto se diferenció del resto de matrices ($p\leq 0,05$) al experimentar una pendiente de liberación de AGL más larga de 45-50 min.

Las diferencias de velocidad y porcentaje de liberación de AGL pudo haberse dado por la composición de la matriz alimentaria, pues el RC fue el mismo para todas. Se observó que el QBG necesitó mayor tiempo de digestión liberándose mayor cantidad de AGL. Estos resultados pueden explicarse por su alto contenido en grasa en comparación con el resto de matrices. Un mayor contenido lipídico, supone mayor presencia de triglicéridos susceptibles de ser digeridos por enzimas características de la digestión lipídica presentes en el modelo de digestión *in vitro* utilizado en nuestro estudio.

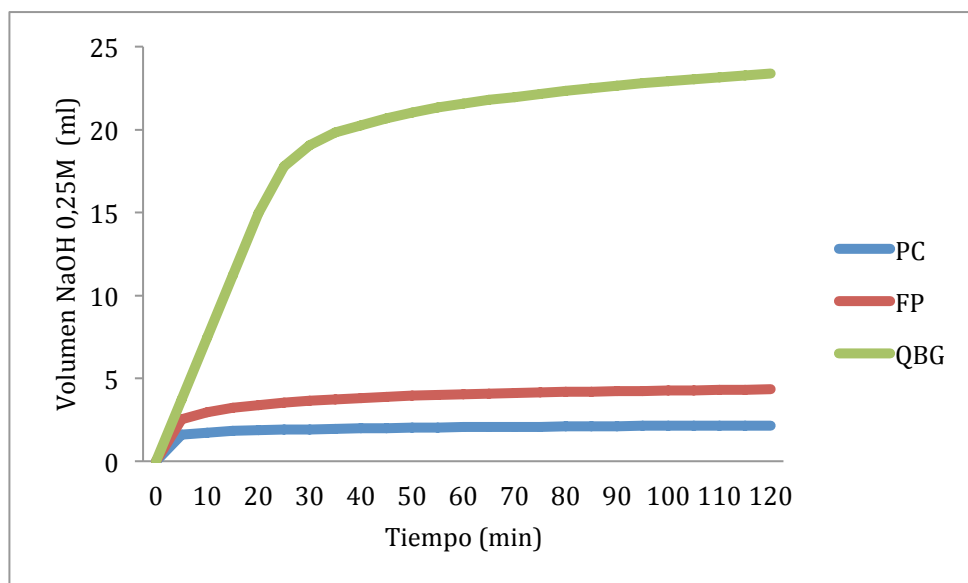


Figura 8. Velocidad de liberación de AGL durante la digestión intestinal *in vitro*, expresada en volumen (ml) de NaOH (0,25M) añadido para mantener pH 7; siendo para Conference (PC) la (línea azul); jamón de Pavo (JP) (línea roja) y queso bajo en grasa (QBG) (línea verde).

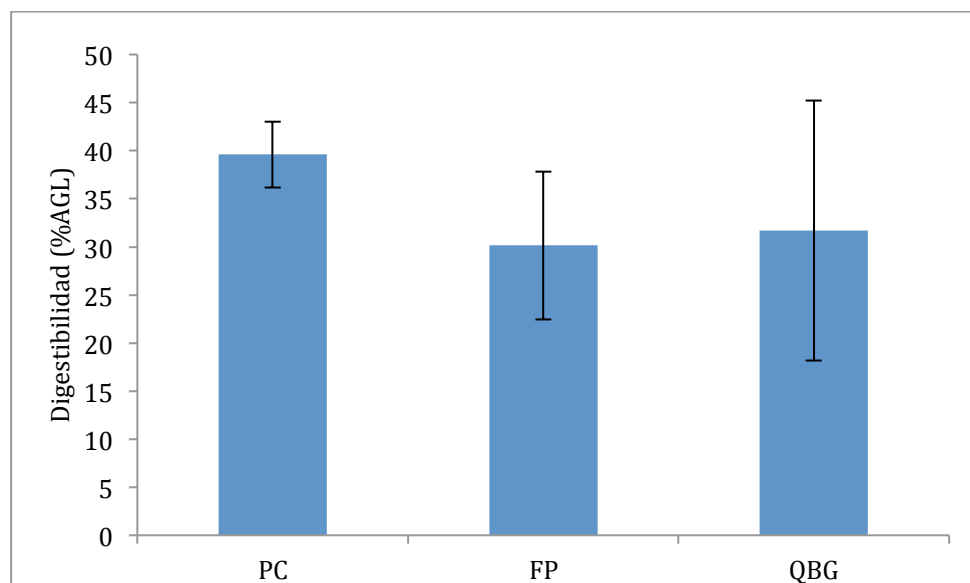


Figura 9. Porcentaje de AGL liberados durante las digestiones intestinales de pera Conference fresca (PC), jamón de pavo (JP) y queso bajo en grasa (QBG).

6.4. Bioaccesibilidad de β -caroteno

Se determinó la bioaccesibilidad de β -caroteno (Figura 11). El porcentaje total de bioaccesibilidad de β -caroteno de la PC fue del 44,25%; 15,63 del JP y 32,8% del QBG. Como se puede observar la bioaccesibilidad de β -caroteno de la PC y el QBG fue superior que la del JP ($p \leq 0,05$).

Nuestros resultados no coincidieron con los observados en un estudio parecido de McClements et al., (2007), donde la matriz con mayor contenido graso obtuvo mayor bioaccesibilidad del compuesto bioactivo añadido en un RC; sin embargo los valores más elevados de bioaccesibilidad de β -caroteno en la digestión de PC podrían explicarse por su elevado contenido en fibra soluble en comparación con el resto de matrices. Alegre (2010) y Lupiañez (2014) observaron que la adición de pectina en las NE aumentaba la bioaccesibilidad de β -caroteno. Falcon (2014) observó el mismo efecto cuando añadió fibra de mandarina a NE; aunque remarcó la importancia de mantener el contenido del biopolímero por debajo del 1% para mantener el aumento de bioaccesibilidad. Lupiañez (2014) defendió que la pectina, como otros polisacáridos, es capaz de atravesar de forma inalterada la mayor parte del tracto digestivo, protegiendo de esta forma el compuesto bioactivo durante las primeras fases digestivas hasta el momento de su absorción y evitando fenómenos de coalescencia y un aumento del tamaño de partícula.

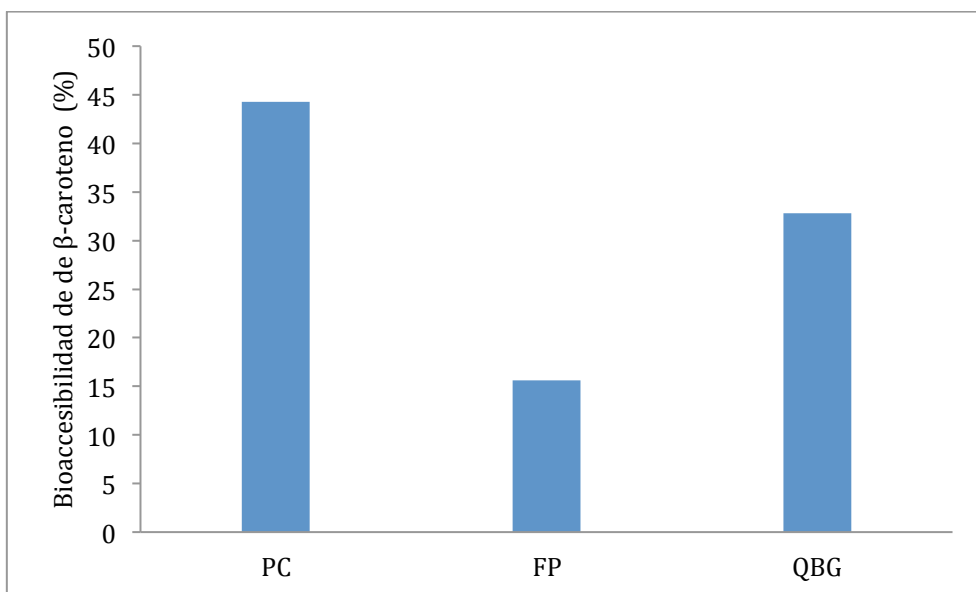


Figura 10. Porcentaje de la bioaccesibilidad de β -caroteno después de la digestión in vitro de pera Conference fresca (PC), jamón de pavo (JP) y queso bajo en grasa (QBG).

6.5. Bioaccesibilidad de vitamina E

Finalmente, se determinó la bioaccesibilidad de vitamina E en los RC de las distintas matrices alimenticias después de su paso por las diferentes fases digestivas, determinando el contenido de vitamina E en la fase micelar a través de un método de HPLC (Figura 12). El porcentaje de bioaccesibilidad en la PC fue del 18,01%; en el JP del 8,22% y del 8,97% en el QBG. El análisis estadístico determinó bioaccesibilidades parecidas en el JP y QBG, valores menores a los observados en la PC ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con los obtenidos por Yang et al., (2015) que estudió los factores que pueden determinar la bioaccesibilidad de la vitamina E incorporada en RC. Estos autores observaron que en los RC a base de un aceite rico en LCT, como el aceite de maíz usado en nuestro estudio, se observaba una mayor bioaccesibilidad de vitamina E en presencia de calcio. En nuestro estudio la muestra con mayor contenido en calcio (QBG) no obtuvo los mejores resultados. En este mismo estudio se describe el efecto del tipo de sales biliares usadas durante la fase de digestión intestinal. Se observó que en presencia de sales biliares puras se obtenían mejores resultados de bioaccesibilidad de vitamina E que en presencia de un extracto de sales biliares. Dado que en nuestro experimento se usaron extracto de sales biliares, quedaría por ver si su sustitución por sales biliares más puras conseguiría mejores valores de bioaccesibilidad de vitamina E. Una mejora de la bioaccesibilidad se observaba al añadir fosfolípidos al entorno digestivo intestinal; la bioaccesibilidad podía aumentar hasta un 66%.

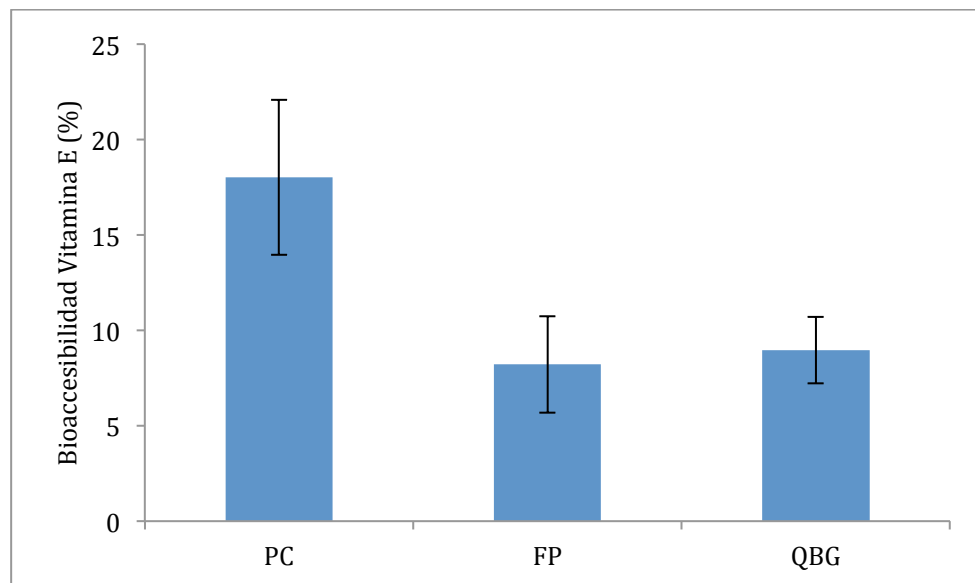


Figura 11. Porcentaje de la bioaccesibilidad de la vitamina E después de la digestión in vitro de pera Conference fresca (PC), jamón de pavo (JP) y queso bajo en grasa (QBG).

7. CONCLUSIONES

- I. El paso de la emulsión de aceite-en-agua por un homogeneizador de altas presiones, generó nanopartículas con un índice de polidispersión adecuado para asegurar su estabilidad frente a las fuerzas de coalescencia.
- II. El alginato sódico aumentó la viscosidad de la nanoemulsión, evitando la separación de fases y asegurando su estabilidad. La presencia de surfactante Tween 20 también contribuyó a la estabilidad de las nanoemulsiones.
- III. El proceso de microfluidización aumento la luminosidad de la nanoemulsión, factor a tener en cuenta porque puede mejorar su aplicabilidad comercial como recubrimiento comestible.
- IV. La digestibilidad de los alimentos analizados fue menor en comparación a la de las nanoemulsiones. Los bajos valores de digestibilidad, obtenidos en nuestro estudio, también se podrían atribuir a la presencia de fibras alimentarias y a la desestabilización del recubrimiento comestible durante el proceso digestivo. Las velocidades de digestión de los alimentos se podría asociar a su contenido graso, así las matrices menos grasas concluyeron la digestión lipídica en un menor tiempo.
- V. Los resultados de este estudio sugieren que la fibra alimentaria como la pectina, presente en matrices como la fruta, puede ser un factor determinante en la buena bioaccesibilidad del β -caroteno, gracias a su efecto protector contra la acción de las enzimas digestivas. Por el otro lado, es posible que el uso de un aceite rico en ácidos grasos de cadena larga como el aceite de maíz, o la presencia de extracto de sales biliares durante la digestión intestinal no contribuyan favorablemente a conseguir buenos resultados de bioaccesibilidad de compuestos bioactivos como la vitamina E.
- VI. El estudio ofrece información valiosa sobre la aplicabilidad de nanoemulsiones como recubrimientos comestibles y como sistemas de suministro de lípidos activos en alimentos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 3–15.
- AESAN. (2009). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de la nanotecnología en la industria alimentaria*.
- Alegre, S. (2014). Millora de l'estabilitat i funcionalitat del β -carotè en productes alimentaris. *Universitat de Lleida*.
- Amparo, L., Marchena, U., Alejandra, G., Parra, M., Adelaida, M., Quiroz, C., ... Gómez, B. D. (2009). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 11(1), 27–38.
- Beysseriat, M., Decker, E. a., & McClements, D. J. (2006). Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20, 800–809.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280, 241–251.
- Brigelius-Flohe, R., Kelly, F. J., Salonen, J. T., Neuzil, J., Zingg, J.-M., & Azzi, A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 703–716.
- Brigelius-Flohé, R., Kluth, D., Landes, N., Pfluger, P., Birringer, M., Packer, L., ... Frei, B. (2002). Mechanisms of vitamin E metabolism. In *The antioxidant vitamins C and E. Proceedings of a symposium held at the 2002 World Congress of the Oxygen Club of California, Santa Barbara, California, USA, 6-9 March 2002*. (pp. 171–179). AOCS Press.
- Csic. (2009). *La alimentación en el siglo XXI*. Editorial CSIC - CSIC Press.
- Cutillas, A. B., Herrero, E., de San Eustaquio, A., Zamora, S., & Pérez-Llamas, F. (2013). Prevalencia de peso insuficiente, sobrepeso y obesidad, ingesta de energía y perfil calórico de la dieta de estudiantes universitarios de la comunidad autónoma de la región de Murcia (España). *Nutricion Hospitalaria*, 28(3), 683–689.
- Díez-Gañán, L., Galán Labaca, I., Domínguez, C. M. L., Gandarillas Grande, A., Zorrilla Torras, B., & Cebrián, F. A. (2007). Ingesta de alimentos, energía y nutrientes en la población de 5 a 12 años de la Comunidad de Madrid: Resultados de la Encuesta de Nutrición Infantil 2001-2002. *Revista Espanola de Salud Publica*, 81(5), 543–558.
- Failla, M. L., & Chitchumroonchokchai, C. (2005). In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. *Harvest Plus Technical Monograph*, 3, 32 pp–32 pp.
- Failla, M. L., Huo, T., & Thakkar, S. K. (2008). In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17, 200–203.

- Falcon, A. G. (2014). Behaviour of Nanoemulsions containing β -carotene under simulated gastrointestinal. *Universitat de Lleida*.
- Febles Fernández, C., Soto Febles, C., Saldaña Bernabeu, A., & García Triana, B. E. (2002). Funciones de la vitamina E: Actualización. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(1), 28–32.
- Figueroa, J. A., & Salcedo, J. G. (2013). Efecto de recubrimientos comestibles a base de almidón nativo y oxidado de yuca sobre la calidad de Mango. *Temas Agrarios*, 18(2).
- Figueroa, J., Salcedo, J., Aguas, Y., Olivero, R., & Narvaez, G. (2011). Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y Perspectiva al uso del propóleo en su formulación. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 3(2), 386–400.
- Gadhav, A. D. (2014). Nanoemulsion formation, stability and applications. *International Journal of Reserch in Science & Advanced Technologies*, 2(3).
- Gliszczyńska-Swigło, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography. A*, 1048(2), 195–8.
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 13, 245–251.
- Innocente, N., Biasutti, M., Venir, E., Spaziani, M., & Marchesini, G. (2009). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of ice cream mixes. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 1864–1875.
- Lupiañez, J. (2014). Influencia de la composición en la digestibilidad y bioaccesibilidad de Judith Lupiañez Serrano Tutora : Gemma Oms Oliu Máster en Gestión e Innovación en la Industria Alimentaria. *Universitat de Lleida*.
- Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2010). Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 984–988.
- Márquez, M., Yépez, C., Naranjo, R. S., & Rincón, M. (2002). Aspectos Básicos y Determinación de las Vitaminas Antioxidantes E y A. *Investigación Clínica*.
- May, C. D. (1997). *Thickening and Gelling Agents for Food*. (A. P. Imeson, Ed.). Boston, MA: Springer US.
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition*.
- McClements, D. J. (2010). Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *Journal of Food Science*, 75(1), R30–42.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719.

- McClements, D. J., Decker, E. a., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), 109–124.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010a). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213–228.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010b). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213–228.
- McHugh, T. H., & Senesi, E. (2000). Apple Wraps: A Novel Method to Improve the Quality and Extend the Shelf Life of Fresh-cut Apples. *Journal of Food Science*, 65(3), 480–485.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Nutritional importance of carotenoid pigments. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*.
- Mínguez Mosquera, M. I., Pérez Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. *Agroscic*, 2–7.
- Observatory Nano, & Commission, E. (2009). Report on Nanotechnology in Agrifood, 46.
- Oms Oliu, G., Dra. Martín Belloso, O., & Soliva Fortuny, R. (2008). Alternativas de envasado de pera y melón frescos cortados en atmósfera modificada. *Universitat de Lleida, Departament de Tecnologia d’Aliments*.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 87–94.
- Ortega Anta, R. M., González-Rodríguez, L. G., Jiménez Ortega, A. I., Estaire Gómez, P., Rodríguez-Rodríguez, E., Perea Sánchez, J. M., & Aparicio Vizuite, A. (2012). Insufficient intake of vitamin D in spanish schoolchildren: determinants of the problem and basis for its improvement. *Nutrición Hospitalaria*, 27(5), 1437–43.
- Ortuño, Á. V. (1999). *Introducción a la química industrial*. Reverte.
- Ouattar, B., Simard, R. E., Pielt, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 139–48.
- Plaza, L., Ancos, B. de, & Cano, M. P. (2013, November 7). Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*.L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. Springer.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135(3), 1440–7.
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008.

- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 237–250.
- Remminghorst, & Rehm. (2009). *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. (R. Bernd, Ed.). Horizon Scientific Press.
- Rivera, V. M. R. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. Netbiblo.
- Robinson, D. K. R., Nanotechnology, I. of, & Mark Morrison. (2009). Report on Nanotechnology in Agrifood.
- Rodriguez-Amaya, D. B. P. D. (1999). *Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados*. Universidad Estatal de Capinas.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438–447.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 401–407.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*, 105, 8–16.
- Sánchez, L., Vargas, M., González, C., Cháfer, M., & Chiralt, a. (2008). Incorporación de productos Naturales en Recubrimientos Comestibles para la Conservación de Alimentos. *VIII Congreso SEAE Bullas 2008*.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., & Singh, H. (2009). Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1270–1278.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P., & Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563–1569.
- Sayago, a, Marín, M. I., Aparicio, R., & Morales, M. T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas Y Aceites*, 58(1), 74–86.
- Sayago, A., Marín, M. I., Aparicio, R., & Morales, M. T. (2007). Vitamin E and vegetable oils. *Grasas y Aceites*, 58(1), 74–86.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10, 102–110.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 72(4), E190–6.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), 107–116.

- Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Ripening Stability. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 24(10), 12758–12765.
- Yang, Y., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2015). Enhancing vitamin E bioaccessibility: factors impacting solubilization and hydrolysis of α -tocopherol acetate encapsulated in emulsion-based delivery systems. *Food & Function*, 6(1), 84–97.
- Yanine, T. N. (2012). Empleo de recubrimientos comestibles con base en almidón de papa y yuca en la conservación del mango cv . Zapote. *Universidad de Pamplona, Alimentech Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, (1), 5–17.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41, 61–68.

